

<b>Requested document:</b>	<a href="#"><b>JP11206381 click here to view the pdf document</b></a>
----------------------------	---

## ISOLATION AND CLONING OF NUCLEIC ACID MOLECULE UTILIZING HAIRPIN-TYPE NUCLEIC ACID PROBE MOLECULE

Patent Number: JP11206381

Publication date: 1999-08-03

Inventor(s): FUJIWARA JUN;; SHIGEMORI YASUSHI

Applicant(s): AISIN COSMOS KENKYUSHO:KK

Requested Patent:  [JP11206381](#)

Application Number: JP19980016987 19980129

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09; C12Q1/68

EC Classification:

Equivalents:

---

### Abstract

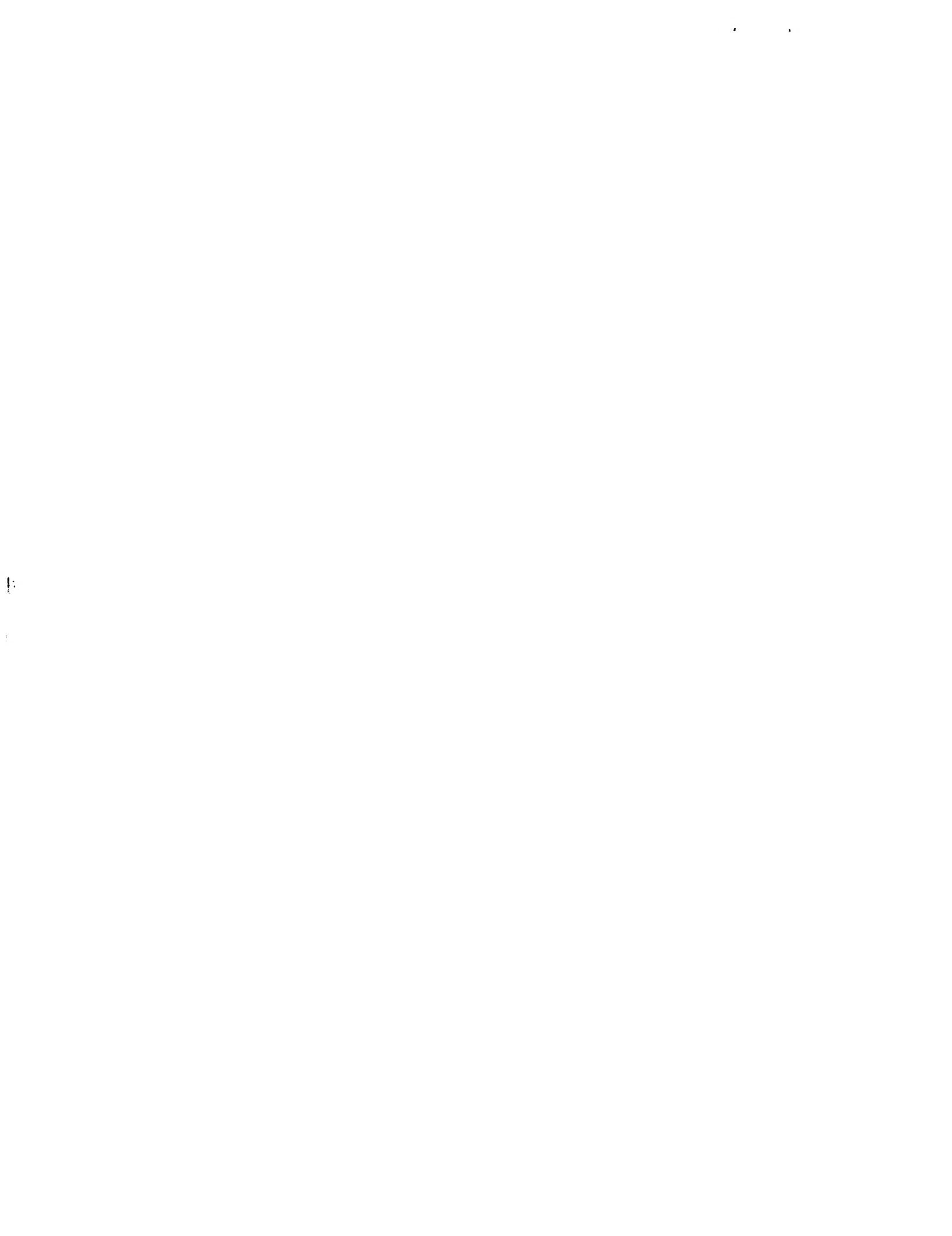
---

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting and isolating a desired target nucleic acid in a short time directly in naturally occurring form without being accompanied by any denaturation or mutation, with no need of constructing any DNA library and screening it.

**SOLUTION:** This method comprises using a nucleic acid probe molecule for hybridization which has a portion with self-complementary stem-loop structure and a 2nd portion with a single-stranded structure extended from one end of the former portion, wherein the single-stranded portion is complementary to a desired nucleotide sequence to be isolated and bears a label for the isolation, hybridizing the probe via a homologous recombinant enzyme with a target nucleic acid molecule, and isolating the aimed target nucleic acid through binding to a solid phase support by the aid of the label.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-206381

(43)公開日 平成11年(1999)8月3日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 15/09  
C 12 Q 1/68

識別記号

ZNA

F I

C 12 N 15/00  
C 12 Q 1/68

ZNAA  
A

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 15 頁)

(21)出願番号 特願平10-16987

(22)出願日 平成10年(1998)1月29日

(71)出願人 593043200

株式会社アイシン・コスモス研究所  
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地

(72)発明者 藤原 純  
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会  
社アイシン・コスモス研究所内

(72)発明者 重森 康司  
愛知県刈谷市八軒町5丁目50番地 株式会  
社アイシン・コスモス研究所内

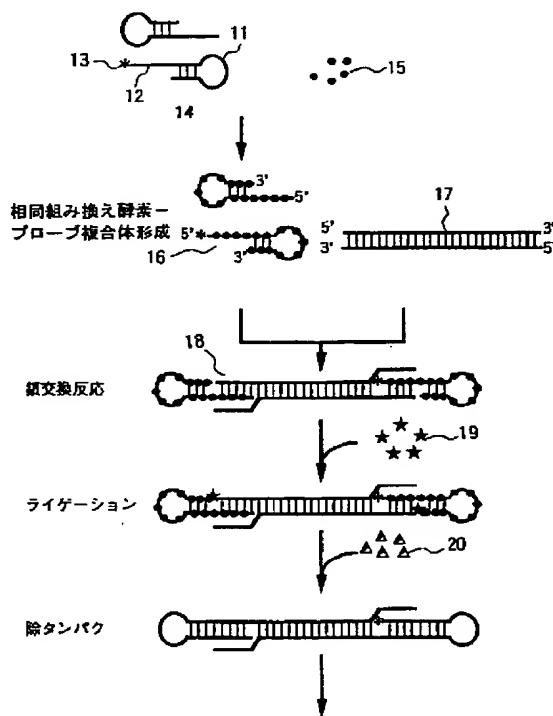
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

(54)【発明の名称】 ヘアピン型核酸プローブ分子を利用した核酸分子の単離及びクローニング

(57)【要約】

【課題】 DNAライブラリーの構築及びそのスクリー  
ニングを必要とせず、短時間に単離でき、且つ標的核酸  
を天然に存在する形のままで検出及び単離が可能であ  
り、且つ変性や突然変異を伴わずに、所望する標的核酸  
を単離することが出来る方法を提供することである。

【解決方法】 自己相補的なヌクレオチド配列を有す  
る部分と、前記部分の一端から延出した一本鎖構造を有  
する部分とを具備し、且つ前記一本鎖部分が単離すべき  
所望のヌクレオチド配列に対して相補的であり、且つ分  
離用標識を有するハイブリダイゼーション用核酸プローブ  
分子を用いることと、前記プローブを相同組み換え酵  
素を介して標的核酸分子にハイブリダイズすることと、  
分離用標識をもって固相担体に結合することにより単離  
することとを具備する核酸単離方法。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 所望するスクレオチド配列を有する標的核酸の単離に用いるためのヘアピン型核酸プローブ分子であって、自己相補的なステム・ループ構造を有する第1のスクレオチド部分と、前記第1のスクレオチド部分の一端から延出した1本鎖構造を有する第2のスクレオチド部分と、前記第1及び第2のスクレオチド部分の少なくとも一方に含まれる分離用標識とを具備し、前記第2のスクレオチド部分は前記所定のスクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的であり、且つ前記分離用標識は特定の物質に対して特異的に結合する能力を有することを特徴とするヘアピン型核酸プローブ分子。

【請求項2】 請求項1に記載のヘアピン型核酸プローブ分子であって、前記第2のスクレオチド部分が、少なくとも15塩基のスクレオチドであることを特徴とするヘアピン型核酸プローブ分子。

【請求項3】 請求項1又は2の何れか1項に記載のヘアピン型核酸プローブ分子であって、前記第1のスクレオチド部分の長さが、少なくとも13塩基のスクレオチドであることを特徴とするヘアピン型核酸プローブ。

【請求項4】 請求項1から3の何れか1項に記載の核酸单離方法であって、前記分離用標識がビオチンまたはディゴキシゲニンであることを特徴とするヘアピン型核酸プローブ。

【請求項5】 請求項1に記載のヘアピン型核酸プローブ分子を利用して、親DNA分子から切り出された所望する配列を有する標的核酸を単離する方法であって、

(1) 前記ヘアピン型核酸プローブ分子と、相同組み換え酵素と、単離すべき標的核酸を含有する試料とを混合し、前記相同組み換え酵素の作用を介して前記ヘアピン型核酸プローブ分子を前記標的核酸にハイブリダイズさせることにより、上記三者の複合体を形成する過程と；

(2) 過程(1)の複合体を形成している前記標的核酸の末端と、前記ヘアピン型核酸プローブの第1のスクレオチド部分の末端との間でリガーゼを作用させることにより、該ヘアピン型核酸プローブと該標的核酸とを連結させる過程と；

(3) 過程(2)で得られた生成物に蛋白質分解酵素を作用させて、相同組み換え酵素及びリガーゼを分解除去する過程と；

(4) 過程(3)で得られた生成物のステム・ループ構造部分にポリメラーゼを作用させることにより、フィルインする過程と；

(5) 過程(4)で得られたフィルイン生成物に含まれている前記分離用標識を固相担体に特異的に結合させ、固相担体に結合しなかった核酸は除去することにより、該生成物を分離した後、制限酵素で切断して該標的核酸を回収する過程と；を具備した方法。

【請求項6】 前記標的核酸分子が二重鎖DNAである

ことを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項5または6に記載の核酸单離方法であって、前記リガーゼが、NAD要求性リガーゼであることを特徴とする方法。

【請求項8】 請求項7に記載の核酸单離方法であって、前記リガーゼを使った反応を、37～75℃の溶液中で行うことを特徴とする方法。

【請求項9】 所定の配列を有する標的核酸をクローニングする方法であって、  
請求項5の過程(5)で回収した前記標的DNAをベクターに組み込むことと、  
該標的細胞を組み込んだベクターを宿主細胞に導入して形質転換を行うことと、  
得られた形質転換細胞をスクリーニングすることとを具備した方法。

【請求項10】 請求項9に記載のクローニング方法であって、前記標的核酸分子を含有する試料を調製する際に、該標的核酸分子自体を認識する制限酵素に加えて、標的核酸を固相担体から回収する時に用いる制限酵素を用いて前記親DNA分子を処理することを具備する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヘアピン型核酸分子を利用した核酸分子の単離方法及びクローニング方法に関する。更に詳しくは、標的核酸との間で安定なハイブリッドを形成できるヘアピン型核酸分子をプローブとして用い、DNAライブラリーの構築及びそのスクリーニングを必要とせず、標的DNAを二重鎖のまま変性することなく単離することが可能なDNA单離方法に関する。また、この単離方法を用いた効率的なクローニング方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来の核酸を単離するための方法には、大きく分けて2つある。第1の方法は、DNAライブラリーの構築を行い、続いて標的のクローニング（ブラークハイブリダイゼーション又はコロニーハイブリダイゼーションによる）を行う方法であり、第2の方法は、PCR法により標的核酸を直接増幅する方法である。

【0003】第1の方法には、非常に高度な熟練した技術と莫大な時間とが必要とされてきた。近年の研究により、RNase H活性を欠損した逆転写酵素の開発（スーパースクリプト、ギブコBRL社）、高効率のパッケージングエキストラクトの開発（ギガパックゴールド、ストラタジーン社）、高効率のコンピテントセルの開発（ウルトラコンピテントセル、スーパーコンピテントセル、ストラタジーン社）、ファージからプラスミドへと簡単に変換できるベクターDNAの開発（入ZAP、ストラタジーン社）等が行われ、それらを用いた技術改良

により、高品質のDNAライブラリーが比較的容易に構築可能となった。

【0004】しかしながら、それでも尚、それらの実施には高度な技術が要求され、誰しもが容易にできると言うわけではなく、更に、膨大な時間と労力の必要性も、未だに欠点として残されている状況にある。

【0005】第2の方法のPCR法では、標的核酸の増幅過程における突然変異の発生や長いDNAが増幅されにくいことが問題となっている。現在、その発生を低減する幾つかの改良方法が開発されている。点突然変異の発生頻度が従来の耐熱性DNAポリメラーゼの約1/10であるPfu DNAポリメラーゼ（ストラタジーン社）、PCR法により最長40kbに及ぶ長い増幅産物を产生することを可能としたエキスパンドロンテンプレートPCRシステム（ベーリングガーマンハイム社）の開発がその例である。

【0006】しかしながら、現実的にPCRを行う以上、低減されたとは言え一定の確立で点突然変異が生じるのは否めず、また、長いDNAに関しては、その増幅の困難さは未だに未解決の状態である。

#### 【0007】

【発明の解決しようとする課題】前述の欠点を克服するために、本発明は、DNAライブラリーの構築及びそのスクリーニングを必要とせず、簡便且つ短時間に単離でき、且つ標的核酸を天然に存在する形のままで、例えそれが長いDNA断片であっても、単離することが可能であり、且つ変性や突然変異を伴わずに、所望する標的核酸を単離することが出来る方法を提供することを目的とする。

【0008】本発明の他の目的は、標的核酸を簡便に且つ効率良くクローニングできる方法を提供することである。更に、上記の方法を実施するためのヘアピン型核酸プローブ分子を提供することもまた本発明の目的である。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決して目的を達成するために、発明者等は、銳意研究の結果、以下のようなヘアピン型核酸プローブ分子を利用した核酸単離方法を見出した。即ち、本発明によるヘアピン型核酸プローブ分子は、所定のヌクレオチド配列を有する標的核酸の単離に用いるためのヘアピン型核酸プローブ分子であって、自己相補的なステム・ループ構造を有する第1のヌクレオチド部分と、前記第1のヌクレオチド部分の一端から延出した1本鎖構造を有する第2のヌクレオチド部分と、前記第1及び第2のヌクレオチド部分の少なくとも一方に含まれる分離用標識とを具備し、前記第2のヌクレオチド部分は前記所定のヌクレオチド配列の少なくとも一部に対して相補的であり、且つ前記分離用標識は特定の物質に対して特異的に結合する能力を有することを特徴とするものである。

【0010】また、本発明による核酸の単離方法は、上記のヘアピン型核酸プローブ分子を利用して、親DNA分子から切り出された所定の配列を有する標的核酸を単離する方法であって、

(1) 前記ヘアピン型核酸プローブ分子と、相同組み換え酵素と、単離すべき標的核酸を含有する試料とを混合し、前記相同組み換え酵素の作用を介して前記ヘアピン型核酸プローブ分子を前記標的核酸にハイブリダイズさせることにより、上記三者の複合体を形成する過程と；

(2) 過程(1)の複合体を形成している前記標的核酸の末端と、前記ヘアピン型核酸プローブの第1のヌクレオチド部分の末端との間でリガーゼを作用させることにより、該ヘアピン型核酸プローブと該標的核酸とを連結させる過程と；

(3) 過程(2)で得られた生成物に蛋白質分解酵素を作用させて、相同組み換え酵素及びリガーゼを分解除去する過程と；

(4) 過程(3)で得られた生成物のステム・ループ構造部分にポリメラーゼを作用させることにより、フィルインする過程と；

(5) 過程(4)で得られたフィルイン生成物に含まれている前記分離用標識を固相担体に特異的に結合させ、固相担体に結合しなかった核酸は除去することにより、該生成物を分離した後、制限酵素で切断して該標的核酸を回収する過程とを具備することを特徴とするものである。

【0011】更に、本発明による標的核酸のクローニング方法は、上記の方法で分離された標的核酸をベクターに組み込み、これを適切な細胞に形質転換し、得られた形質転換細胞をスクリーニングするものである。

#### 【0012】

【発明の実施の形態】本発明の核酸単離方法を用いて単離することが可能な核酸分子は、一本鎖のDNA及び二本鎖DNA並びにRNAであるが、二本鎖DNAがより好ましい。このように、二本鎖DNAをそのまま単離できることが、本発明の主要な利点である。

【0013】本発明の方法で用いられるヘアピン型核酸プローブ（以後「ヘアピン型プローブ」又は単に「プローブ」とも称す）は、ヘアピン型RNAプローブでもヘアピン型DNAプローブでも使用することは可能であるが、ヘアピン型DNAプローブがより好ましい。

【0014】本発明の標的核酸（以後「標的分子」又は「標的核酸分子」とも称す）の単離方法において使用するヘアピン型プローブ分子の好ましい態様について、図面を参照して説明する。図1には、本発明によるヘアピン型核酸プローブ分子の一例14が示されている。このプローブ分子14は、ステム・ループ構造（stem and loop structure）11を有する3'末端側の第1のヌクレオチド部分と、この第1ヌク

レオチド部分の一端から5'末端側に延出した一本鎖の第2のヌクレオチド部分12と、5'末端に結合された分離用標識13とを具備している。

【0015】第1のヌクレオチド部分におけるステム・ループ構造11の形成は、この部分のヌクレオチド鎖が自己相補性を有することによる。前記第2のヌクレオチド部分12は、標的DNA17の末端配列に相補的な配列を有する。この標的DNA17の末端配列に相補的な部分は、鎖交換反応時及びそれに続くライゲーション反応時に、該プローブ14と該標的核酸17との間の安定な中間体18の形成を可能にする長さを有し、この長さは少なくとも15塩基のヌクレオチドであることが好ましい。更に、鎖交換反応時及びライゲーション反応時に該中間体18を安定に存在させるために必要な該プローブ14の長さは、該プローブ14中のGC含有量等を左右するような標的DNAの配列の特徴、並びに反応温度及び反応液中の塩濃度等の諸条件により影響されるものであるが、このことは、当業者に周知である。更に、標的DNA17の末端配列の特徴及び反応条件に応じて、該プローブ14の長さを調節すべきであるということも当業者にとって周知のことである。

【0016】また、本発明の方法で用いるヘアピン型プローブ14は、直鎖状の一本鎖をヘアピン状に折り返してステム・ループ部分11を形成し、一部を二本鎖することによって安定化を計っている。同時に、このようなステム・ループ部分11を形成することにより、核酸プローブ14の5'末端側にある第二のヌクレオチド部分12が標的核酸17の5'末端側の配列とハイブリダイズして組換え中間体18を形成したときに、該プローブ14とハイブリダイズした方の標的DNA鎖17の5'末端へ、プローブ14の3'末端を近接させることができる。更に、本発明の好ましいヘアピン型核酸プローブ14では、この組み換え中間体18において、該ステム・ループ構造11の3'末端のヌクレオチドと、標的二本鎖DNA17のうちの該プローブ14とハイブリダイズした方の鎖の5'末端ヌクレオチドとの間にギャップが生じないように構成される。このことによって、プローブ14の3'末端を標的DNA鎖17の5'末端へライゲートすることが可能になる。

【0017】また、このステム・ループ構造部分11の長さは、該ヘアピン型プローブ分子14と標的分子17との間のハイブリッド形成条件下において、自己相補的塩基間で結合することを保証する長さであることが好ましい。

【0018】該ステム・ループ部分11のステム部分は、合計で12から30塩基のヌクレオチドが好ましく、該ループ部分は、1から10塩基のヌクレオチドが好ましい。そして該ステム・ループ部分11は全体として、13から40塩基のヌクレオチドであることが好ましい。

【0019】本発明の方法で用いるヘアピン型プローブ14は、該ステム・ループ部分11の3'末端に、この末端部分において適切な制限酵素で切断が可能であるような認識配列を有する。この適切な制限酵素は、当業者に公知の如何なる制限酵素でもよいが、Not I、Asp I、Fse I、Srf I等が好ましい。

【0020】該ヘアピン型プローブ14は、化学合成法等の当業者に周知の如何なる方法によても製造することが可能であり、この方法により得られたヘアピン型プローブ14は塩基配列決定用ゲルを用いたゲル泳過等の当業者に周知の方法により精製されることが好ましい。

【0021】本発明の方法で用いるヘアピン型プローブ14に付加する分離用標識13は、互いに親和性を有する一対の物質の何れか一方を使用することが可能である。具体的には、ビオチンとストレプトアビシン、ディゴキシゲニンと抗ディゴキシゲニン抗体等の組み合わせにおける一方を使用することが好ましい。

【0022】前記分離用標識物質13の該ヘアピン型プローブ14への結合は、化学合成法等の当業者に周知の如何なる方法によても行うことが可能である。本発明においては、前記分離用標識13を、該ヘアピン型プローブ14における第2のヌクレオチド部分12の5'末端へ付加する代わりに、当該技術分野で周知の方法により、他の如何なる部分にも付加することが可能である。

【0023】本発明の核酸単離方法においては、上記で説明したヘアピン型プローブ分子14とは対称的に、5'末端側にステム・ループ構造11の第1のヌクレオチド部分を有し、3'末端側に一本鎖の第2のヌクレオチド部分12を有するようなヘアピン型核酸14を使用することも可能である。

【0024】次に、本発明のヘアピン型核酸プローブ分子14を利用した核酸単離方法の好ましい態様を、図1及び図2に示した作業スキームに従って詳細に説明する。

### 1. 標的核酸の単離

#### (1) 相同組み換え酵素・ヘアピン型DNAプローブ複合体の形成

先ず、本発明のヘアピン型核酸プローブ14と相同組み換え酵素15とを接触させて相同組み換え酵素・ヘアピン型プローブ複合体16を形成する(図1、相同組み換え酵素-プローブ複合体形成)。

【0025】本発明の方法で使用する相同組み換え酵素15は、元来、DNAに突然変異を生じた場合の、DNA修復反応の一種である組み換え反応、即ち変異部位を正常な塩基配列に組み換える反応に関与するタンパク質である。また、該相同組み換え酵素15の酵素活性は、ATP存在下で一本鎖ポリヌクレオチドと結合することによって活性化される。更に、該相同組み換え酵素15は、ATPアーゼ活性を有し、二本鎖DNAを部分的に巻き戻して、これと部分的に相補的な一本鎖DNAとを

結合させることにより、DNAの組み換えを行う酵素である。

【0026】本発明の単離方法では、該相同組み換え酵素15を、二本鎖標的DNA17中の所定の塩基配列部位と、前記プローブ14の第1のスクレオチド部分である一本鎖DNA12とを特異的に結合させるために、先ず相同組み換え酵素・ヘアピン型プローブ組み換え複合体16を形成させて用いる。

【0027】本発明の方法においては、相同組み換え能を有する如何なる酵素も相同組み換え酵素として使用することが可能であり、その例としては、大腸菌由来のRecaタンパク質、酵母由来のRad51タンパク質、耐熱性細菌であるサーマス・サーモフィルス(Theromus thermophilus)のRecAタンパク質等が挙げられる。

#### 【0028】(2) 鎮交換反応

次に、相同組み換え酵素組み換え中間体である該相同組み換え酵素・ヘアピン型プローブ複合体16に、標的DNA17を接触させる(図1、鎮交換反応)。このときに、該相同組み換え酵素の酵素活性に必須のATPの代わりに、ATP $\gamma$ S(アデノシン5'-O-(3-チオ三リン酸))等のATP類縁体を使用すると、鎮交換反応においてヘアピン型プローブ・標的DNAの反応中間体が形成されたところで反応が停止するので好ましい。

【0029】ATP類縁体の代わりにATPを使用すると、溶液中の相同組み換え酵素のATPアーゼ活性により反応液中のADP濃度が上昇してしまう。このADP濃度の上昇は、該相同組み換え酵素・ヘアピン型プローブ・標的核酸の反応中間体からの該相同組み換え酵素の解離を引き起こしてし、該ハイブリッド核酸が解消してしまう恐れがあるため好ましくない。

#### 【0030】(3) ライゲーション

該反応中間体18が形成された後、これに対してリガーゼ19を作用させて、該プローブの3'末端と、標的二本鎖DNAのうち該プローブとハイブリダイズしている鎖の5'末端との間の連結を行う(図1、ライゲーション)。

【0031】前述の通り、本発明の方法においては、ATPを用いることが好ましくないため、ここで使用するリガーゼ19は、NADをエネルギーとして要求するタイプが好ましい。NAD要求性リガーゼは、例えば、高熱細菌から抽出された耐熱性リガーゼ等、NAD要求性である如何なるものも使用可能である。

【0032】該ライゲーションの反応温度は、該プローブと該標的核酸末端との間に安定なハイブリッド形成がなされ、且つ効率的な連結反応が保証される温度が望ましく、37から75°Cの間の温度が好ましい。

#### 【0033】(4) 除タンパク

該ライゲーション反応終了後、相同組み換え酵素を除去するために除タンパクを行う(図1、除タンパク)。除

タンパク可能な如何なる蛋白分解酵素の使用も可能であるが、プロテアーゼK20の使用が好ましい。

【0034】次いで、標的DNA17にハイブリダイズしなかった該ヘアピン型プローブ14をゲル汎過等の当業者に周知の方法により除去する。

#### (5) フィルイン

上記除タンパクにより得られた生成物に対してフィルインを行う(図2、フィルイン)。フィルインとは、該標的DNA17にハイブリダイズした該ヘアピン型プローブ14の該ステム・ループ部分11の湾曲を熱変性により直線的にしながら、二本鎖部分から延出した一本鎖部分を、DNAポリメラーゼにより伸張し二本鎖にすることである。

【0035】本発明の方法においては、該フィルインと同時に、標的DNA17にハイブリッドした該プローブ14のループ部分11を直線化することも併せて行うために、直線化が可能な温度でフィルインの反応を行うことが必要であり、72°Cで30分間の反応条件にて行うことが好ましい。

#### 【0036】(6) プローブ・標的DNAの固相担体への結合及び分離並びに標的DNAの切り出し

該フィルインしたプローブ・標的DNA複合体を、該複合体中の分離用標識13と親和性を有する固相担体22に結合させる(図2、結合標識物質を固相担体に結合)ことにより分離回収する。該固相担体22には、該複合体の分離用標識13に対して親和性を有する捉獲物質23を結合させておく。例として、ビオチンとストレブトアビジン、ディゴキシゲニンと抗ディゴキシゲニン抗体等のように、互いに親和性を有する一对の物質の内どちらか一方であって、該複合体の分離用標識13ではない方である。

【0037】また、固相担体22としては、各種材料で作られた当業者に周知のビーズに前記捉獲物質23を結合し、これをそのまま使用しても、またカラムに充填して使用してもよく、その他の如何なる当業者に周知の固相担体を用いてもよい。

#### 【0038】(7) 試験用標的DNAの処理

(図2、試験用標的DNAの処理)。本発明の該標的核酸17を単離する方法においては、該ヘアピン型核酸プローブ14を1種類用いて、該標的核酸17の3'末端側又は5'末端側のどちらか片側にハイブリダイズさせることによって該標的核酸17を単離してもよく、また、本発明のヘアピン型核酸プローブ14を2種類用いて、該標的核酸17の3'末端及び5'末端の両側にハイブリダイズすることによって、該標的核酸17を単離すること也可能である。しかし、両端に該プローブ14をハイブリダイスすることによって、ライゲーションの効率が向上し、また、クローニングにおけるベクターへのインサートがスムーズになり、更にベクターの調製が簡素化でき

ることを考慮すると、両端にプローブ14をハイブリダイズすることにより単離する方法がより好ましい。

#### 【0039】2. クローニング

切り出した該標的DNAを組み込み部分25として、プラスミドベクターDNA24に常法により組み込み（図2、ベクターへ組み込み）、当業者に周知の方法により形質転換（図2、トランスフォーメーション）を行って、クローニングを行う。得られたコロニーのスクリーニング（図2、陽性コロニーの選択）は、当業者に公知の如何なる方法によっても行うことが可能である。

#### 【0040】

【実施例】以下に具体例を挙げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明の趣旨を越えない限り、実施例に限定されるものではない。

実施例1：63量体のヘアピン型DNAプローブ分子を利用したショウジョウバエ*fushi tarazu*遺伝子の制限酵素FspI断片（1753bp）の単離  
本発明が、ヘアピン型DNAプローブ（以後単に「プローブ」とも称す）を利用することによって、標的DNAを含有する試料から該標的DNAを直接単離することが可能であることを示し、尚且つ、ベクターに組み込んだ単離した該標的DNAをクローニングすることが可能であることを示すために以下の実験を行った。

#### 【0041】<実験材料及び実験方法>

##### 1. 標的DNAの単離

###### (1) RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体の形

###### 反応液A：

10X緩衝液A	2. 5 μL
48mM反応液ATPγS (Sigma社)	2. 5 μL
1μg/μLヘアピン型DNAプローブ (FTZ-B2-63)	0. 25 μL
1μg/μLヘアピン型DNAプローブ (FTZ-1-63)	0. 25 μL
RecA	7. 68 μL
蒸留水	11. 82 μL
	計25 μL

###### 反応液B：

10X反応液B	2 μL
48mM反応液ATPγS (Sigma社)	2 μL
4μg/μLショウジョウバエ染色体DNA制限酵素切斷断片	10 μL
蒸留水	6 μL

計20 μL

尚、上記の10X緩衝液の詳細は、各々次のとおりである。

10X緩衝液A：300mMトリス・酢酸 (PH 7.

2) + 25mM酢酸マグネシウム

10X緩衝液B：300mMトリス・酢酸 (PH 7.

2) + 225mM酢酸マグネシウム。

【0045】調製した前記反応液Aを、該RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体形成のために37°Cで15分間反応させ、その一方で、反応液Bを、37°Cで15分間インキュベーションした。その後、20 μLの該

##### 成、及び鎖交換反応

標的DNAを含有する試料として、ショウジョウバエ染色体DNAを、ショウジョウバエ*fushi tarazu*遺伝子の制限酵素であるFspIで切断したショウジョウバエ染色体DNA制限酵素切斷断片を用いた。

【0042】ヘアピン型DNAプローブとして、配列番号1（名称FTZ-B2-63（以下単に「FTZ-B2-63」とも称す））及び配列番号2（名称FTZ-1-63（以下単に「FTZ-1-63」とも称す））を使用した。これらは、標的DNAと相補的な配列を一部に含んでいる。即ち、FTZ-B2-63は、標的DNAの5'末端のリーディング鎖の配列と相補的な配列を有し、FTZ-1-63は、標的DNAの3'末端のラギング鎖の配列と相補的な配列を有している。

【0043】前記2種類のヘアピン型DNAプローブは、当業者に周知の化学合成法により作成し、塩基配列決定用ゲルを用いて精製（PAGE精製）した。また、当業者に周知の化学合成法によって、FTZ-B2-63の5'末端には、分離用標識13としてビオチンを結合した。

【0044】相同組み換え酵素として、市販のRecAタンパク質（Epicentre technology社）を使用した。上記のRecAタンパク質・ヘアピン型DNAプローブ複合体を形成し、鎖交換反応を行うために用いるために、反応液A及び反応液Bを以下のように調製した。

反応液A：	2. 5 μL
10X緩衝液A	2. 5 μL
48mM反応液ATPγS (Sigma社)	0. 25 μL
1μg/μLヘアピン型DNAプローブ (FTZ-B2-63)	0. 25 μL
RecA	7. 68 μL
蒸留水	11. 82 μL
	計25 μL
反応液B：	2 μL
10X反応液B	2 μL
48mM反応液ATPγS (Sigma社)	10 μL
4μg/μLショウジョウバエ染色体DNA制限酵素切斷断片	6 μL
蒸留水	計20 μL

反応液Aを20 μLの該反応液Bに添加し、混合して、37°Cで120分間反応させることにより、鎖交換反応を行った。

##### 【0046】(2) ライゲーション

該標的DNAの3'末端及び5'末端に各々ハイブリダイスしたFTZ-B2-63とFTZ-1-63を、標的DNAの各々の末端に連結させるライゲーションを行った。

【0047】以下のようなライゲーション反応液を調製した。

## ライゲーション反応液:

10Xアンブリガーゼ DNA リガーゼ RXD緩衝液 (Epicentre technology社)	10 $\mu$ L
100ユニット/ $\mu$ Lアンブリガーゼ (Epicentre technology社)	1.0 $\mu$ L
蒸留水	39 $\mu$ L

計50  $\mu$ L。

【0048】上記のライゲーション反応液のうち40  $\mu$ Lを、上記(1)の操作で得られた反応液に添加し、60°Cで一晩反応させた。その後、反応停止液(0.11 MEDTA、5.6% SDS)7.2  $\mu$ Lを添加し、反応を停止した。

【0049】(3) RecAタンパク質の除去及び未反応物の除去

上記(2)で得られた反応液に、20 mg/mLのプロテアーゼK (JERSEY LAB SUPPLY社)を4  $\mu$ L添加し、37°Cで15分間反応させることにより、該プローブ・DNA複合体に結合しているRecAタンパク質を分解した。得られた反応液を、Sephacyl S-400 (Amersham Pharmacia biotech社)を充填したスピンカラム

## フィルイン用反応液:

10XTaqDNAポリメラーゼ緩衝液 (Boehringer Mannheim社)	5 $\mu$ L
2.5mM dNTPs (タカラ)	4 $\mu$ L
5ユニット/ $\mu$ L TaqDNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim社)	0.25 $\mu$ L
	計9.25 $\mu$ L。

【0051】(5) プローブ・標的DNA複合体の固相担体への結合

当業者に周知の方法によりストレプトアビジンでコートした磁気ビーズ (Promega社) 20  $\mu$ L分を、シリコンコートしたサンプルチューブに分取して固相担体とした。これをTE緩衝液 (1 mM EDTA、10 mMトリス・塩酸、pH 8.0) で3回洗浄した。上記

(4)で得られた該プローブ部分のフィルインを終了した反応液(50  $\mu$ L)を前記固相担体に加え、室温で40分間静置し、該標的DNAを含むフィルイン生成物を磁気ビーズに結合させた。上清を除去した後、0.1% SDS緩衝液(0.1% SDS、100 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mMトリス・塩酸、pH 8.0)を添加し、50°Cの恒温槽で10分間の放置の後に上清を除去した。この操作を2回繰り返した。得られた該ビーズを、室温にてトリス緩衝液(500 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mMトリス・塩酸、pH 8.0)で洗浄した。続いてTE緩衝液(1 mM EDTA、10

10XNE緩衝液3 (New England Biolabs社)	2 $\mu$ L
100 mg/mLBSA (New England Biolabs社)	0.2 $\mu$ L
No t I (10ユニット/ $\mu$ L, New England Biolabs社)	1 $\mu$ L

計3.2  $\mu$ L。

を適用してゲル汎過することにより、未反応ヘアピン型プローブを除去した後、その溶出液をフェノール抽出、クロロホルム抽出し、20 mg/mLのグリコーゲン (Boehringer Mannheim社) 1  $\mu$ Lを添加してエタノール沈殿を行った。DNAペレットをさらに70%のエタノールでリンスし、真空ポンプで乾燥させてから蒸留水40.75  $\mu$ Lに溶かした。

【0050】(4) フィルイン

上記(3)の操作で得られたDNA乾燥物が蒸留水に溶解した後、この40.75  $\mu$ LのDNA溶液に以下のフィルイン用反応液を添加して全量を50  $\mu$ Lとした。これを37°Cで30分間反応させることにより、該ヘアピン型プローブを直線状に伸ばすと共に、標的DNAとハイブリッドしているプローブ部分を二重鎖化した。

mMトリス・塩酸、pH 8.0)を用い、同様に室温にて該ビーズを3回洗浄した。得られたビーズを、1.00  $\mu$ Lの該TE緩衝液に懸濁し、シリコンコート済みの新しい別のサンプルチューブに移し、TE緩衝液を除いた。

【0052】(6) 標的DNAの固相担体からの切り出し

標的DNAの両末端にハイブリダイズされた本発明の該プローブは、過程(4)の操作(フィルイン)により二重鎖化されると、適切な位置に制限酵素No t Iにより認識される配列が出来るよう設計されている。従って、該標的DNAは、以下の方法に従って、制限酵素No t Iにより切り出すことが可能である。

【0053】過程(5)で得られたビーズを蒸留水16.8  $\mu$ Lに懸濁し、以下に記述の酵素溶液等を計3.2  $\mu$ L添加して全量20  $\mu$ Lとした。これを37°Cで60分間反応させ、該ビーズに結合している該標的DNAを切り出した。

2  $\mu$ L0.2  $\mu$ L1  $\mu$ L計3.2  $\mu$ L。

## 【0054】2. クローニング

## (1) ベクターDNAへの組み込み

上記(6)の操作により得られた該標的DNAを、当業者に周知の方法によりフェノール抽出及びクロロホルム抽出した。ベクターDNA (Not Iで切断して直鎖状にしたpZErO-1, Invitrogen社) 25 ng及び20 mg mLグリコーゲン (Boehringer Mannheim社) 1 μLを加えてエタノール沈殿を行った。得られたDNAペレットをさらに70 %のエタノールでリンスした後、真空ポンプで乾燥し、蒸留水4 μLに溶解した。これに以下の溶液を添加して全量を5 μLとし、該標的DNAをベクターDNAに組み込んだ。

10Xライゲーション用緩衝液 (New England Biolabs社) 0.5 μL  
400ユニット / μL T4DNAリガーゼ  
(New England Biolabs社) 0.5 μL

## 【0055】(2) 形質転換及びクローニング

当業者に周知の方法により、XL1-BLueスーパーコンピテントセル (Stratagene社) 100 μLを用いて形質転換を行った後、次のようにしてクローニングを行った。

## 低塩LB寒天A :

バクトトリプトン 1 %  
イーストエキストラクト 0.5 %  
NaCl 0.5 %  
寒天 1.6 %  
Zeocin (Invitrogen社) 50 μg/mL  
IPTG (JERSEY LAB SUPPLY社) 1 mM.

【0057】上記の培養の後、コロニーを形成した各々の大腸菌について、以下のLB培養液Bに接種して37 °Cで16~24時間培養した。

## 低塩LB寒天B :

バクトトリプトン 1 %  
イーストエキストラクト 0.5 %  
NaCl 0.5 %  
寒天 1.6 %  
Zeocin (Invitrogen社) 25 μg/mL

【0058】ここで用いたベクターは、pZErO-1 (Invitrogen社) であり、薬剤耐性マーカーはゼオシン (zeocin: gyraseの阻害剤) である。前記ベクターは、lacZとccdB (大腸菌致死遺伝子) の融合遺伝子の中に外来DNAを組み組むためのマルチクローニングサイドを有する。外来遺伝子を持たないpZErO-1により形質転換した大腸菌は、ccdBの作用で致死するのに対し、外来遺伝子を組み込まれた該pZErO-1は、該組み込みのためにccdBが失活するので生育する。このことをを利用してスクリーニングを行った。また、このときに、培地中にゼオシンを添加することにより、ゼオシン耐性のないものについては生育することが不可能である条件とした。

【0059】(3) プラスミドDNAの抽出及び解析  
プラスミド自動分離装置 (KURABO社) を用いて、上記(2)で得られた大腸菌よりプラスミドDNAを抽出し、各々について電気泳動を行った。この電気泳動の結果により明らかになった、外来DNAが組み込まれているプラスミドDNAをNot Iにより切断して切り出し、更に電気泳動を行って前記外来DNAの分子量を調べた。その得られた分子量から、標的DNAに類似した

ger Mannheim社) 1 μLを加えてエタノール沈殿を行った。得られたDNAペレットをさらに70 %のエタノールでリンスした後、真空ポンプで乾燥し、蒸留水4 μLに溶解した。これに以下の溶液を添加して全量を5 μLとし、該標的DNAをベクターDNAに組み込んだ。

10Xライゲーション用緩衝液 (New England Biolabs社) 0.5 μL  
400ユニット / μL T4DNAリガーゼ  
(New England Biolabs社) 0.5 μL

ニングを行った。

【0056】以下に示す低塩LB寒天Aに大腸菌を接種して37°Cで16~22時間培養した。

バクトトリプトン 1 %  
イーストエキストラクト 0.5 %  
NaCl 0.5 %  
寒天 1.6 %  
Zeocin (Invitrogen社) 50 μg/mL  
IPTG (JERSEY LAB SUPPLY社) 1 mM.

37°Cで16~24時間培養した。

バクトトリプトン 1 %  
イーストエキストラクト 0.5 %  
NaCl 0.5 %  
寒天 1.6 %  
Zeocin (Invitrogen社) 25 μg/mL

分子量の外来DNAを含有するベクターDNAについて、Not I及び適切な制限酵素、この場合はFsp Iで切断し、電気泳動を行うことにより得られた切断パターンを、予想される切断パターンと比較して得られたDNAの解析を行った。

## &lt;実験結果&gt;

## 【0060】

## 【表1】

表 1

総コロニー数	80
外来DNAを保持したクローン数	19
標的DNAを保持したクローン数	1
外来DNA保持クローンに対する標的DNA保持クローンの割合	5.3%

【0061】表1に示すとおりの数値で、該標的DNAを保持したクローンを得ることが出来た。この結果は、従来のDNAを単離する方法、即ちDNAライブラリーの構築を必要とする方法及びPCR法により行う方法に比較して高い値である。

【0062】以上の実験結果から、本発明の方法の実施

によって、標的DNAを二本鎖のままで、簡便且つ効率的に単離し、クローニングできることが明らかとなつた。

実施例2：2種類のヘアピン型DNAプローブを利用した、ヒトゲノム当たり1コピーの遺伝子断片の直接単離本発明が、ヘアピン型DNAプローブ（以後単に「プローブ」とも称す）を利用することによって、ヒト由来の標的DNAを含有する試料からの該標的DNAの直接単離及び該標的DNAのクローニングが可能であることを示すために以下のような実験を行った。

#### 【0063】<実験材料及び実験方法>

##### 1. 標的DNAの単離

(1) RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体の形成、及び鎖交換反応  
標的DNAを含有する試料として、ヒト染色体DNAをヒトβ-アクチン遺伝子の制限酵素EcoRV、Apalで切断したヒト染色体DNA制限酵素切斷断片を用いた。また、ヒト染色体からの試料調製時に、該2種類の制限酵素と共に、標的DNAを固相担体から回収する時に用いる制限酵素であるNotIを加えて切り出した。

##### 反応液A：

10X緩衝液A	1.2 μL
48mM反応液ATPrS (Sigma社)	1.2 μL
1μg/μLヘアピン型DNAプローブ (ACT-3-63)	1.2 μL
1μg/μLヘアピン型DNAプローブ (ACT-B1-63)	1.2 μL
RecA	36.9 μL
蒸留水	56.7 μL
	計120 μL

##### 反応液B：

10X反応液B	1.0 μL
48mM反応液ATPrS (Sigma社)	1.0 μL
4μg/μLヒト染色体DNA制限酵素切斷断片	5.0 μL
蒸留水	30 μL
	計100 μL

尚、上記の10X緩衝液の詳細は、各々次のとおりである。

10X緩衝液A：300mMトリス・酢酸(PH7.2) / 25mM酢酸マグネシウム

10X緩衝液B：300mMトリス・酢酸(PH7.2) / 225mM酢酸マグネシウム。

【0067】調製した前記反応液Aを、該RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体形成のために37°Cで15分間反応させ、その一方で、反応液Bを、37°Cで15分間インキュベーションした。その後、100 μLのライゲーション反応液

10Xアンブリガーゼ DNA リガーゼ RXD緩衝液 (Epicentre technology社)	48 μL
100ユニット/μLアンブリガーゼ (Epicentre technology社)	4.8 μL

【0064】ヘアピン型DNAプローブとして、配列番号3（名称ACT-3-63（以下単に「ACT-3-63」とも称す））及び配列番号4（名称ACT-B1-63（以下単に「ACT-B1-63」とも称す））を使用した。これらは、標的DNAと相補的な配列を一部に含んでいる。即ち、ACT-3-63は、標的DNAの5'末端のリーディング鎖の配列と相補的な配列を有し、ACT-B1-63は、標的DNAの3'末端のラギング鎖の配列と相補的な配列を有している。

【0065】前記2種類のヘアピン型DNAプローブは、当業者に周知の化学合成法により作成し、塩基配列決定用ゲルを用いて精製（PAGE精製）した。また、当業者に周知の化学合成法によって、ACT-B1-63の5'末端にはビオチンを結合した。

【0066】相同組み換え酵素として、市販のRecAタンパク質（Epicentre technology社）を使用した。上記のRecAタンパク質・ヘアピン型DNAプローブ複合体を形成し、鎖交換反応を行うために用いるために、反応液A及び反応液Bを以下のように調製した。

該反応液Aを100 μLの該反応液Bに添加し、混合して、37°Cで120分間反応させることにより、鎖交換反応を行った。

#### 【0068】(2) ライゲーション

標的DNAの3'末端及び5'末端に各々ハイブリダイスしたACT-3-63とACT-B1-63を、標的DNAの各々の末端に連結させるライゲーションを行った。

【0069】以下のようなライゲーション反応液を調製した。

## 蒸留水

【0070】上記のライゲーション反応液のうち200 μLを、上記(1)の操作で得られた反応液に添加し、60°Cで一晩反応させた。その後、反応停止液(5.6% SDS、0.11M EDTA)7.2μLを添加し、反応を停止した。

【0071】(3) Rec Aタンパク質の除去及び未反応物の除去

上記(2)の操作で得られた反応液に、20mg/mLのプロテアーゼK(JERSEY LAB SUPPLY社)を20μL添加し、37°Cで15分間反応させることにより、ヘアピン型DNAプローブ・DNA複合体に結合しているRec Aタンパク質を分解した。得られた反応液を6等分し、Sephacryl S-400(Amersham Pharmacia biotech社)を充填した6本のスピンドラムを適用してゲル

## フィルイン用反応液:

10XTaq DNAポリメラーゼ緩衝液  
(Boehringer Mannheim社)  
2.5mM dNTPs(タカラ)  
5ユニット/μL Taq DNAポリメラーゼ  
(Boehringer Mannheim社)

187.2μL

計240μL

沪過することにより、未反応ヘアピン型プローブを除去した後、その溶出液をフェノール抽出、クロロホルム抽出し、20mg/mLのグリコーゲン(Boehringer Mannheim社)1μLを添加してエタノール沈殿を行った。DNAペレットをさらに70%のエタノールでリンスし、真空ポンプで乾燥させてから各々蒸留水40.75μLに溶かした。

【0072】(4) フィルイン

上記(3)の操作により得られたDNA乾燥物が蒸留水に溶解した後、この40.75μLのDNA溶液に以下のフィルイン用反応液を添加して全量を50μLとした。これを72°Cで30分間反応させることにより、ヘアピン型プローブを直線上に伸ばすと共に、標的DNAとハイブリッドしているプローブを二重鎖化した。

5μL

4μL

0.25μL

計9.25μL

## 2. クローニング

(1) ベクターDNAへの組み込み

実施例1に記述の方法に従いクローニングを行い、更に、実施例1の記述の方法により、プラスミドDNAを抽出して解析を行った。但し、この解析におけるDNAの切断には、Not I並びにEco RV及びApa LIを用いた。

## &lt;実験結果&gt;

【0074】

【表2】

表 2

総コロニー数	187
外来DNAを保持したクローン数	41
標的DNAを保持したクローン数	7
外来DNA保持クローンに対する標的DNA保持クローンの割合	17.1%

【0075】表2から明らかであるように、本発明の方法の実施により、ヒト染色体DNAに関しても、目的とする遺伝子断片を染色体DNAから直接に単離でき、且つ従来の方法に比較して、簡便且つ効率的に単離及びスクリーニング出来ることが明らかとなった。

【0076】実施例3: 染色体DNAから標的DNAを含有する試料を調製する際の制限酵素Not Iの効果

<実験材料及び実験方法>本発明のヘアピン型DNAプローブ

ロープ（以後単に「プローブ」とも言う）を利用して標的DNAを単離する方法を用いるに当たり、該標的DNAを含有する試料を、細菌若しくは組織標本等の染色体DNAから調製する際に、所望の標的DNAを得るために制限酵素で切断すると同時に、制限酵素Not I（標的核酸を固相担体から回収する時に用いる制限酵素）で処理することによって、所望の標的DNAを高率で得ることが出来ることを証明するために、Not I処理群と非処理群を比較する以下のような実験を行った。

#### 【0077】1. 試料の調製

##### (1) ヘアピン型DNAプローブ

本発明のヘアピン型DNAプローブとして、配列番号5（名称TRI-G2-63（以下単に「TRI-G2-63」とも称す））及び配列番号6（名称TRI-BG-63（以下単に「TRI-BG-63」とも称す））を使用した。これらは、該標的DNAの末端部分と相補的な配列を含んでいる。即ち、TRI-G2-63は、該標的DNAである大腸菌RecG遺伝子の制限酵素FspI切断断片における5'末端のリーディング鎖の配列と相補的な配列からなり、TRI-BG-63は、該制限酵素切断断片の3'末端のラギング鎖の配列と相補的な配列からなる。

【0078】前記2種類のヘアピン型DNAプローブは、当業者に周知の化学合成法により作成し、塩基配列決定用ゲルを用いて精製（PAGE精製）した。また、当業者に周知の化学合成法によって、TRI-BG-63の5'末端にはビオチンを結合した。

##### 【0079】(2) 試料の調製

標的DNAを含有する試料として、大腸菌染色体DNAを大腸菌RecG遺伝子の制限酵素FspIで切断して調製した大腸菌染色体DNA制限酵素切断断片を用い

##### 反応液A：

10X緩衝液A	5 μL
4.8 mM反応液ATPγS (Sigma社)	5 μL
1 μg/μLヘアピン型DNAプローブ (TRI-G2-63)	0.5 μL
1 μg/μLヘアピン型DNAプローブ (TRI-BG-63)	0.5 μL
RecA	15.36 μL
蒸留水	23.64 μL
	計50 μL

##### 反応液B：

10X反応液B	2 μL
4.8 mM反応液ATPγS (Sigma社)	2 μL
4 μg/μL大腸菌染色体DNA制限酵素切断断片 (Not I処理群、又は対照群)	10 μL
蒸留水	6 μL
	計20 μL

尚、上記の10X緩衝液の詳細は、各々次のとおりである。

10X緩衝液A：300 mMトリス・酢酸（PH7.2）/25 mM酢酸マグネシウム

た。

【0080】即ち、実験に用いた試料は、以下のようない大腸菌染色体DNAを制限酵素で切断することにより調製した。先ず、Not I処理群は、制限酵素FspI及びNot Iで切断した大腸菌染色体DNA切断断片（標的DNAを含有）0.4 μgと、制限酵素EcoRV及びNot Iで切断した大腸菌染色体DNA切断断片（標的DNAを含有しない）39.6 μgとを混合して調製した。一方で、対照群は、制限酵素FspIを用いて切断した大腸菌染色体DNA切断断片（標的DNAを含有）0.4 μgと、制限酵素EcoRVで切断した大腸菌染色体DNA切断断片（標的DNAを含有しない）39.6 μgとを混合して調製した。

【0081】ここで、EcoRVで切断した大腸菌染色体DNA切断断片を、該両群に添加しているのは希釈のためである。本来、この実施例における実験条件は、ヒト染色体DNA切断断片から所望する標的DNAを単離するために設定したものであり、そのため、大腸菌染色体切断断片を試料とする場合には、該試料中に含まれる標的DNAの数が多くなり過ぎてしまう。従って、ヒト染色体切断断片試料に対応した結果を得るためにには、該試料中の標的DNAの比率をヒト染色体の場合に合わせるために希釈が必要であった。

#### 【0082】2. 標的DNAの単離

(1) RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体の形成、及び鎖交換反応相同組み換え酵素として、市販のRecAタンパク質（Epicentre technology社）を使用した。

【0083】該RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体の形成及び鎖交換反応を行うために以下の反応液A及び反応液Bを調製した。

10X緩衝液B : 300 mMトリス・酢酸 (PH7.2) / 25 mM酢酸マグネシウム。	10X緩衝液B : 300 mMトリス・酢酸 (PH7.2) / 25 mM酢酸マグネシウム。
【0084】調製した前記反応液Aを、該RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体形成のために37°Cで1	【0084】調製した前記反応液Aを、該RecA・ヘアピン型DNAプローブ複合体形成のために37°Cで1

5分間反応させ、その一方で、反応液Bを各々に37℃で15分間インキュベーションした。その後、反応液Aを20μL分取し、反応液B20μLに添加して全量40μLとし、混合して37℃で120分間、鎖交換反応をした。

#### 【0085】(2) ライゲーション

##### ライゲーション反応液:

10Xアンプリガーゼ DNA リガーゼ RXD緩衝液 (Epicentre technology社)	20μL
100ユニット/μLアンプリガーゼ (Epicentre technology社)	2μL
蒸留水	78μL

計100μL。

#### 【0086】(3) RecAタンパク質の除去及び未反応物の除去

上記(2)で得られた反応液に、20mg/mLのプロテアーゼK (JERSEY LAB SUPPLY社)を4μL添加し、37℃で15分間反応させることにより、プローブ・DNA複合体に結合しているRecAタンパク質を分解した。得られた反応液を、Sephacyrly S-400 (Amersham Pharmacia biotech社)を充填したスピンカラムを適用してゲル沪過することにより、未反応ヘアピン型プローブを除去した後、その溶出液をフェノール抽出、クロロホルム抽出し、20mg/mLのグリコーゲン (Boehringer Mannheim社) 1μLを添加してエタノール沈殿を行った。DNAペレットをさらに70%のエタノールでリンスし、真空ポンプで乾燥させてから蒸留水40.75μLに溶かした。

上記(3)で得られたDNA乾燥物が蒸留水に溶解した後、この40.75μLのDNA溶液に以下のフィルイン用反応液を添加して全量を50μLとした。これを72℃で30分間反応させることにより、ヘアピン型プローブを直線状に伸ばすと共に、標的DNAとハイブリッドしているプローブを二重鎖化した。

#### 【0087】(4) フィルイン

上記(3)で得られたDNA乾燥物が蒸留水に溶解した後、この40.75μLのDNA溶液に以下のフィルイン用反応液を添加して全量を50μLとした。これを72℃で30分間反応させることにより、ヘアピン型プローブを直線状に伸ばすと共に、標的DNAとハイブリッドしているプローブを二重鎖化した。

##### フィルイン用反応液:

10XTaqDNAポリメラーゼ緩衝液 (Boehringer Mannheim社)	5μL
2.5mM dNTPs (タカラ)	4μL
5ユニット/μL TaqDNAポリメラーゼ (Boehringer Mannheim社)	0.25μL

計9.25μL

・塩酸、pH8.0)を用いて、同様に室温にて該ビーズを3回洗浄した。このビーズを、100μLのTE緩衝液に懸濁し、シリコンコート済みの新しい別のサンプルチューブに移し、TE緩衝液を除いた。

#### 【0088】(6) 標的DNAの固相担体からの切り出し

実施例1に記述の方法により標的DNAを固相担体から切り出した。

#### 3. クローニング及び解析

実施例1に記述の方法により、クローニングを行い、更に実施例1に記述の方法により、プラスミドDNAを抽出し、解析を行った。但し、この解析におけるDNAの切断には、Not I並びにFsp Iを用いた。

#### <実験結果>

#### 【0089】

#### 【表3】

(5) プローブ・標的DNA複合体の固相担体への結合  
当業者に周知の方法によりストレプトアビシンでコートした磁気ビーズ (Promega) 20μL分を、シリコンコートしたサンプルチューブに分取して固相担体とした。これをTE緩衝液 (1mMEDTA、10mMトリス・塩酸、pH8.0) で洗浄した。上記(4)で得られた該プローブ部分のフィルインを終了した反応液 (50μL) を前記固相担体に加え、室温で40分間静置して、標的DNAを含むフィルイン生成物を磁気ビーズに結合させた。上清を除去した後、0.1%SDS緩衝液 (0.1%SDS、100mMNaCl、1mMEDTA、10mMトリス・塩酸、pH8.0) を添加し、50℃の恒温槽で10分間の放置の後に上清を除去した。この操作を2回繰り返した。得られた該ビーズを、室温にてトリス緩衝液 (500mMNaCl、1mMEDTA、10mMトリス・塩酸、pH8.0) で洗浄した。TE緩衝液 (1mMEDTA、10mMトリス

表 3

	染色体処理方法	
	対照群	No t I 処理群
総コロニー数	333	519
外来DNAを保持したクローン数	36	54
標的DNAを保持したクローン数	7	15
外来DNA保持クローンに対する 標的DNA保持クローンの割合	19.4%	27.8%

【0090】表3に示す通り、染色体DNAを切断することによりDNA断片得る際にNo t I処理を行った場合の方が、該操作を行わない場合と比較して、より多くの標的DNAを保持したクローンを得ることが出来た。このとき、インサートされたクローンの内の外来DNAを保持したクローン数と標的DNAを保持したクローン数の割合は、No t I処理を行った場合の方が高かった。

【0091】また、従来のDNAライブラリーの構築する単離方法の場合、クローニングの対象となる遺伝子に依存して增幅の容易さが異なるために、標的とするDNAに依存して、該標的DNAを保持したクローンが殆ど得られないような場合もあった。しかし、本発明の核酸分子単離及びそのクローニング方法を用いた場合には、上記のような標的DNAに依存したばらつきは見られず、安定して該標的DNAを保持したクローン数を得れることも明らかとなった。

#### 【0092】

【発明の効果】本発明の方法において、ヘアピン型構造の核酸プローブを用いることにより、該プローブと標的核酸との安定したハイブリッドの形成がなされ、所望の目的とする核酸を単離することが出来る。

##### 配列：

TCGGCACACG CTCGCCGTTA TAGCGCATAA ATATCCCTGC GCGGCCGCGG TTTCCGCGGC	60
CGC	63

配列番号：2

配列の名称：FTZ-1-63

配列の長さ：63

配列の型：核酸

##### 配列：

CCTACGGTGC CCAGGACATT TTGGGCACAA GGACGAGTGC GCGGCCGCGG TTTCCGCGGC	60
CGC	63

配列番号：3

配列の名称：ACT-3-63

配列の長さ：63

配列の型：核酸

##### 配列：

TGCACATGCC GGAGCCGTTG TCGACGACGA GCGCGGCGAT GCGGCCGCGG TTTCCGCGGC	60
---	----

【0093】相同組み換え酵素を介して、ヘアピン型核酸プローブを用いることで、目的とする核酸を、そのままの形で、つまり、二本鎖DNAであれば二本鎖のまままで、変性や突然変異を伴わずに単離することが可能である。

【0094】DNAライブラリーの構築及びそのスクリーニングを行うことなく、標的とする核酸を直接に単離することが出来るので、時間と労力の短縮化が可能である。クローニングにおいて得られる標的DNAを保持したクローンの数は、該標的DNAに依存したばらつきがなく、安定して得ることが可能である。

#### 【0095】

##### 【配列表】

配列番号：1

配列の名称：FTZ-B2-63

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

特記事項：5'末端にビオチンが付加

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

CGC

63

配列番号：4

配列の名称：A C T - B 1 - 6 3

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

特記事項：5'末端にビオチンが付加

配列：

GTGGGTGCT	TTCCCTGCCTG	AGCTGACCTG	GGCAGGTCAG	GCGGCCGCGG	TTTCCGCGGC	60
CGC						63

配列番号：5

配列の名称：T R I - G 2 - 6 3

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

配列：

TCGCTAACGCT	GTAGCGTCGG	TGGCGGGCGG	TGCAAAGTGC	GCGGCCGCGG	TTTCCGCGGC	60
CGC						63

配列番号：6

配列の名称：T R I - B G - 6 3

配列の長さ：63

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成D N A

特記事項：5'末端にビオチンが付加

配列：

TGCAAGTGCT	GCGCGACAGT	AACGACGGTT	TTGTGATTGC	GCGGCCGCGG	TTTCCGCGGC	60
CGC						63

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のヘアピン型D N Aプローブを用いたD N A単離方法及びクローニング方法の概略を示す図。

【図2】本発明のヘアピン型D N Aプローブを用いたD N A単離方法及びクローニング方法の概略を示す図。

## 【符号の説明】

1 1…第1スクレオチドであるステム・ループ構造部分

1 2…第2スクレオチドである一本鎖構造部分

1 3…分離用標識物質

1 4…ヘアピン型D N Aプローブ

1 5…相同組み換え酵素

1 6…相同組み換え酵素・ヘアピン型D N Aプローブ複合体

1 7…標的D N A

1 8…組み換え中間体

1 9…リガーゼ

2 0…プロテアーゼK

2 1…制限酵素認識部位

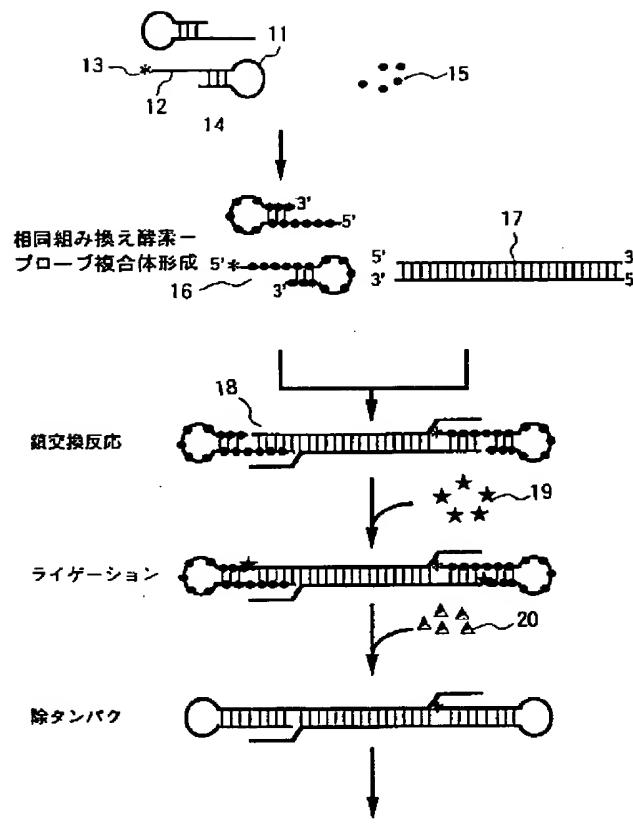
2 2…固相担体

2 3…捉獲物質

2 4…プラスミド

2 5…ベクター組み込み部分

【図1】



【図2】

